

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y – DƯỢC**

-----oO-----

**BÁO CÁO TÓM TẮT**

**ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP ĐẠI HỌC**

**THIẾT KẾ TÁI TỔ HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP GÂY ĐỘT BIẾN  
MẤT GEN *ncsB3* TỪ CHỦNG *STREPTOMYCES CARZINOSTATICUS*  
ATCC15944 VÀ KIỂM TRA HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CHỦNG  
ĐỘT BIẾN**

**Mã số: ĐH2013-TN07-03**

**Chủ nhiệm đề tài: TS Vũ Thị Thu Hằng**

**THÁI NGUYÊN, 2019**

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y - DƯỢC**

-----oOo-----

**BÁO CÁO TÓM TẮT  
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP ĐẠI HỌC**

**THIẾT KẾ TÁI TỔ HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP GÂY ĐỘT BIẾN  
MẤT GEN *ncsB3* TỪ CHỦNG *STREPTOMYCES CARZINOSTATICUS*  
ATCC15944 VÀ KIỂM TRA HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CHỦNG  
ĐỘT BIẾN**

**Mã số: DH2013-TN07-03**

**Chủ nhiệm đề tài: Vũ Thị Thu Hằng**

**Người tham gia thực hiện:**

- GS.TS Jae Kyung Sohng
- TS Tạ Thị Thu Thủy
- TS Nguyễn Thị Ngọc Hà
- CN Nông Thị Thu
- ThS Nguyễn Văn Thắng

**Xác nhận của cơ quan chủ trì đề tài**  
*(ký, họ tên, đóng dấu)*

**THÁI NGUYÊN NĂM 2019**

# MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ</b> .....	1
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU NGHIÊN CỨU</b> .....	2
<b>1.1. Tổng quan về xạ khuẩn</b> .....	2
1.1.1. Đặc điểm chung của xạ khuẩn.....	2
1.1.2. Sự hình thành chất kháng sinh từ xạ khuẩn.....	2
1.1.3. Kháng sinh enediyne.....	2
<b>1.2. Neocarzinostatin</b> .....	2
1.2.1. Cấu tạo hóa học của neocarzinostatin .....	2
1.2.2. Các hướng nghiên cứu về sinh tổng hợp NCS.....	3
<b>1.3. Kỹ thuật sinh học phân tử áp dụng trong thiết kế vector chuyển gen.</b> .....	4
1.3.1. Kỹ thuật khuếch đại gen (PCR: Polymerase Chain Reaction) .....	4
1.3.2. Phương pháp giải trình tự gen.....	4
1.3.3. Kỹ thuật tách dòng (cloning) .....	4
1.3.4. Kỹ thuật biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn.....	4
<b>Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	5
<b>2.1. Vật liệu nghiên cứu</b> .....	5
2.1.1. Chủng giống và môi trường nuôi cấy .....	5
2.1.2. Vector và các plasmid tái tổ hợp .....	5
2.1.3. Hóa chất.....	5
2.1.4. Tách chiết DNA và giải trình tự gen.....	5
<b>2.2. Dụng cụ, thiết bị</b> .....	5
2.2.1. Dụng cụ, thiết bị nuôi cấy.....	5
2.2.2. Dụng cụ, thiết bị pha chế môi trường nuôi cấy.....	5
2.2.3. Dụng cụ, thiết bị cho quá trình tách chiết và phân tích chất.....	5
<b>2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu</b> .....	5
2.3.1. Thời gian nghiên cứu.....	5
2.3.2. Địa điểm nghiên cứu.....	5
<b>2.4. Phương pháp nghiên cứu</b> .....	5
2.4.1. Các bước chính trong nghiên cứu.....	5
2.4.2. Phương pháp gây đột biến mất gen <i>ncsB3</i> bằng trao đổi chéo.....	6
<b>2.5. Các kỹ thuật áp dụng thực hiện trong đề tài</b> .....	6
2.5.1. Kỹ thuật khuếch đại gen PCR và ghép nối vào vector.....	6
2.5.2. Phản ứng cắt và nối bằng enzyme giới hạn.....	7
2.5.3. Phương pháp chuyển gen vào TB trần từ <i>S.carzinostaticus</i> ATCC15944 .....	8
2.5.4. Phương pháp sàng lọc khuẩn lạc chuyển gen.....	8
2.5.5. Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh .....	8
2.5.6. Nuôi cấy xạ khuẩn và tách chiết NCS.....	8
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN</b> .....	9
<b>3.1. Thiết kế tái tổ hợp mất gen <i>ncsB3</i> ở chủng <i>S.carzinostaticus</i></b> .....	9
3.1.1. Kết quả gắn upstream và downstream trong pGEM - T easy .....	9
3.1.2. Kết quả gắn upstream, downstream và gen <i>neor</i> vào vector pKC1139 .....	9
3.1.3. Kiểm tra độ nhạy với kháng sinh của <i>S.carzinostaticus</i> .....	10
3.1.4. Chuyển tổ hợp gen vào <i>S.carzinostaticus</i> .....	11
<b>3.2. Kiểm tra hoạt tính sinh học chủng đột biến</b> .....	12
3.2.1. Phân tích sản phẩm tách chiết .....	12
3.2.2. So sánh hoạt tính kháng khuẩn .....	14
<b>Chương 4: KẾT LUẬN</b> .....	14
<b>Chương 5: KHUYẾN NGHỊ</b> .....	14

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Tên đầy đủ</b>
apoNCS	Neocarzinostatin apoprotein
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
ESI/MS	Mass spectrometry
HPLC	High-performance liquid chromatography
<i>M.luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
NCS	Neocarzinostatin
NCS- chromophore	Neocarzinostatin chromophore
RNA	Ribonucleic Acid
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>

# THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

## 1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: **Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gen *ncsB3* từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944 và kiểm tra hoạt tính sinh học của chủng đột biến**

- Mã số: **ĐH2013-TN07-03**

- Chủ nhiệm đề tài: TS Vũ Thị Thu Hằng

- Tổ chức chủ trì: Trường Đại học Y – Dược Thái Nguyên, Đại học Thái Nguyên

- Thời gian thực hiện: **2 năm (2013-2014)**

## 2. Mục tiêu:

2.1. *Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gen *ncsB3* từ chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944.*

2.1. *Kiểm tra hoạt tính sinh học của tái tổ hợp đột biến.*

## 3. Tính mới và sáng tạo:

Nghiên cứu này cung cấp thêm minh chứng vai trò của gen *ncsB3* trong con đường sinh tổng hợp naphthoic acid của kháng sinh neocarzinostatin, ngoài ra với kết quả nghiên cứu là bước đầu trong việc tạo ra các sản phẩm tương đồng từ xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 bằng phương pháp gây đột biến mất gen.

## 4. Kết quả nghiên cứu:

Thiết kế thành công chủng xạ khuẩn đột biến gây mất gen *ncsB3* từ chủng xạ khuẩn gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944 bằng phương pháp thay thế gen.

Bước đầu đã kiểm tra và so sánh được hoạt tính sinh học của chất chiết tách từ chủng xạ khuẩn đột biến so với chủng xạ khuẩn gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944.

## 5. Sản phẩm:

### 5.1. Sản phẩm khoa học:

- 1 bài báo đăng trên tạp chí sinh học của Hàn Quốc:

Vu Thi Thu Hang, Tae Jin Oh & Jae Kyung Sohng (2015), “Phân tích sản phẩm của chủng đột biến gen *ncsB3* - P450 hydroxylase từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944”, *J.Biomolecule Reconstruction*, 12 (1-2), tr. 9-14.

- 1 bài báo đăng trên tạp chí công nghệ của Việt Nam:

Vũ Thị Thu Hằng, Vũ Thị Hà, Tạ Thị Thu Thủy & Jae Kyung Sohng (2014), “Xác định môi trường tối ưu nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*, 12 (126), tr. 41-44.

- Tham gia báo cáo poster tại 01 Hội thảo Quốc tế lần thứ nhất về ứng dụng Vi sinh học diễn ra tại Thành phố Hồ Chí Minh.

Số poster: P0828-05.

Tiêu đề poster: Phân tích sản phẩm của chủng đột biến gen *ncsB3* - P450 hydroxylase từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944.

### 5.2. Sản phẩm đào tạo:

- Hướng dẫn khóa luận tốt nghiệp cho 01 sinh viên Đại học:

Vũ Thị Hà (2014), *Nghiên cứu quy trình nuôi cấy và tách chiết kháng sinh Neocarzinostatin từ chủng *S.Cazinostaticus**, Khóa luận tốt nghiệp, Trường Đại học Y – Dược, Đại học Thái Nguyên.

## 6. Phương thức chuyển giao, địa chỉ ứng dụng, tác động và lợi ích mang lại của kết quả nghiên cứu:

Nghiên cứu sẽ còn tiếp tục thực hiện trong Labo để xác định hoạt tính của các sản phẩm tách chiết từ chủng đột biến. Sản phẩm sẽ được nghiên cứu thử nghiệm trên tế bào động vật để xác định hoạt tính của độc chất.

Ngày 10 tháng 7 năm 2019

**Tổ chức chủ trì**  
(ký, họ và tên, đóng dấu)

**Chủ nhiệm đề tài**  
(ký, họ và tên)

**TS Vũ Thị Thu Hằng**

## INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

### 1. General information:

Project title: **Constructing the recombinant of disruption *ncsB3* from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944 and checking the bioactivity of mutant.**

Code number: **DH2013-TN07-03**

Coordinator: PhD Vu Thi Thu Hang

Implementing institution: Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy

Duration: 2 years (from 2013 to 2014)

### 2. Objective(s):

2.1. *Constructing the recombinant by deleting *ncsB3* from *S.carzinostaticus* ATCC15944*

2.2. *Checking the bioactivity of mutant.*

### 3. Creativeness and innovativeness:

This research provided more the evidence to prove the role of *ncsB3* in the biosynthetic pathway of naphthoic acid moiety that consists of neocarzinostatin. Additionally, this results is the initial for engineering the analog of neocarzinostatin.

### 4. Research results:

We are succeeded in designing the recombinant that deleted *ncsB3* from *S.carzinostaticus* ATCC15944. The mutant strain was supposed to be the analogs of neocarzinostatin. The products were extracted from mutant strain by the same way to do with wild type strain, then checked the bioactivity to compare with NCS.

### 5. Products:

#### 5.1. Science products

- One paper was published in Biology journal of Korea.

Vu Thi Thu Hang, Tae Jin Oh & Jae Kyung Sohng (2015), "Analysis the product of deletion *ncsB3* - P450 hydroxylase from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944", *J.Biomolecule Reconstruction*, N°1-2 (Vol12), pp 9-14.

- One paper was published in Biotechnology of Vietnam

Vũ Thị Thu Hằng, Vũ Thị Hà, Tạ Thị Thu Thủy & Jae Kyung Sohng (2014), "Determined the opimisinom to culture *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944", *Biotechnology of Vietnam*, N°126 (Vol12), pp 41-44.

#### 5.2. Training products:

- Guided an undergraduated student:

Vu Thi Ha (2014), The study of culture and isolation *Neocarzinostatin* from *S.Cazinostaticus*, Undergraduated thesis, Thai Nguyen University of Medicine & Pharmacy.

### 6. Transfer alternatives, application institutions, impacts and benefits of research results:

This research will be continued in Laboratory to determine the activity of products isolated from the mutant. Futher doing they will be checked the toxic on the animal cells.

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Neocarzinostatin (NCS), là kháng sinh thuộc nhóm kháng sinh tự nhiên enediyne và được tách chiết từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944. NCS-chromophore là một phần cấu tạo nên NCS có khả năng ức chế sự tổng hợp DNA dẫn đến sự gián đoạn DNA trong tế bào, vì vậy NCS được ứng dụng trong điều trị một số bệnh ung thư do khả năng chống lại sự nhân lên ác tính của các tế bào non.

Kháng sinh enediyne thuộc nhóm kháng sinh có hoạt tính sinh học mạnh nhất và nổi bật nhất đối với tế bào ung thư. Tuy nhiên, đối lập với hoạt tính chống ung thư nổi bật, các sản phẩm enediyne tự nhiên ít được sử dụng trên lâm sàng vì độc tính muộn của chúng.

Một trong những hướng nghiên cứu gần đây làm hạn chế tác dụng phụ của enediyne nói chung hay NCS nói riêng bằng cách là tạo ra thuốc sản phẩm đồng đẳng của chúng làm giảm được độc lực của chúng. Việc tạo ra được các sản phẩm như vậy rất cần thiết cho lâm sàng và nó cũng là xu hướng nghiên cứu trong lĩnh vực enediyne.

Một số nghiên cứu trước đây cho thấy sau khi loại bỏ cytochrome P450 có khả năng tạo ra các chất đồng phân mới hoặc làm tăng sản lượng các chất. Trong hệ gen của chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944, *ncsB3* là gen được chứng minh là cytochrome P-450 hydroxylase, tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gốc naphthoic acid của NCS.

Với xu hướng nghiên cứu tạo sản phẩm mới làm giảm tác dụng phụ trên lâm sàng của NCS, chúng tôi tiến hành đề tài “Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gene *ncsB3* từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944 và kiểm tra hoạt tính sinh học của chủng đột biến” với 2 mục tiêu sau:

**1. Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gen *ncsB3* từ chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944.**

**2. Kiểm tra hoạt tính sinh học của tái tổ hợp đột biến.**

## Chương 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU NGHIÊN CỨU

#### 1.1. Tổng quan về xạ khuẩn

##### 1.1.1. Đặc điểm chung của xạ khuẩn

Xạ khuẩn (Actinomycetales) là nhóm vi sinh vật đơn bào hay vi khuẩn thật. Phần lớn xạ khuẩn là các tế bào Gram (+), hoại sinh, có cấu tạo sợi phân nhánh. Xạ khuẩn phân bố rộng rãi trong tự nhiên, chúng được nghiên cứu rất nhiều vì chúng có vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất của tự nhiên, đặc điểm quan trọng bậc nhất của xạ khuẩn là khả năng sinh chất kháng sinh, trong đó 60-70% xạ khuẩn phân lập được từ đất có khả năng này. Trong số khoảng 8000 chất kháng sinh hiện đã được biết đến trên thế giới thì trên 80% là do xạ khuẩn. Xạ khuẩn thường được chia thành hai loại: *Streptomyces* và không phải *Streptomyces* (non-*Streptomyces*). Chi xạ khuẩn được biết nhiều nhất là *Streptomyces*, với khoảng 500 loài. Một phần rất lớn các chất kháng sinh được sử dụng hiệu quả trong điều trị có nguồn gốc từ các loài *Streptomyces* trong đó được biết đến nhiều nhất là streptomycin, erythromycin và tetracycline.

##### 1.1.2. Sự hình thành chất kháng sinh từ xạ khuẩn

Chất kháng sinh là sản phẩm trao đổi chất bậc hai, thông thường được hình thành ở cuối pha sinh trưởng, trong pha cân bằng. Các hợp chất kháng sinh khác nhau của xạ khuẩn đã được nghiên cứu đặc điểm gồm aminoglycoside, anthracyclin,  $\beta$ -lactam, macrolides, actinomycin và tetracycline... Một số nhóm kháng sinh đã được dùng trong điều trị ung thư có thể kể đến là anthracycline, actinomycin và bleomycin có nguồn gốc từ xạ khuẩn.

##### 1.1.3. Kháng sinh enediyne

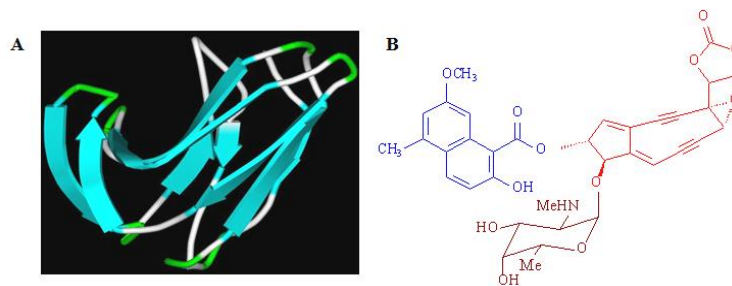
Rất nhiều sinh vật có khả năng sản xuất tự nhiên các hợp chất enediyne. Các kháng sinh enediyne tự nhiên là các sản phẩm trao đổi chất bậc hai được sinh ra chủ yếu bởi đất và vi sinh vật biển. Thực tế các enediyne là một trong những chất có khả năng kháng ung thư mạnh nhất được nghiên cứu. Các enediyne nhận được sự quan tâm chú ý đặc biệt trong vòng hai thập kỷ gần đây không chỉ bởi cấu trúc đặc biệt mà còn bởi hoạt tính kháng sinh chống ung thư đáng chú ý của chúng. Ví dụ, calicheamicin và shishijimicin A có hoạt tính chống ung thư mạnh gấp 4000 và 13000 lần so với thuốc chống ung thư adriamycin đang được sử dụng rộng rãi hiện nay. Các nghiên cứu cho thấy enediyne xen vào cấu trúc DNA của tế bào ung thư và phá hủy chúng. Mặc dù hoạt tính chống ung thư của nhóm kháng sinh enediyne rất nổi bật, nhưng ứng dụng của chúng trên lâm sàng còn hạn chế do độc tính muộn của các sản phẩm enediyne. Để vượt qua những khó khăn này, một số các enediyne biến đổi đã được chuẩn bị cho mục đích lâm sàng và hứa hẹn có những triển vọng tốt đẹp.

#### 1.2. Neocarzinostatin

##### 1.2.1. Cấu tạo hóa học của neocarzinostatin

Neocarzinostatin (NCS) là một trong những kháng sinh được nghiên cứu nhiều nhất trong nhóm kháng sinh enediyne, chúng được tách chiết từ xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944. Kháng sinh này đã được xác định có khả năng ức chế tổng hợp DNA và làm giảm chất lượng của DNA trong tế bào. NCS có cấu tạo gồm 2 phần: protein (NCS-apoprotein) và phần non-protein (NCS-chromophore) theo tỉ lệ 1:1. (Hình 1.3).



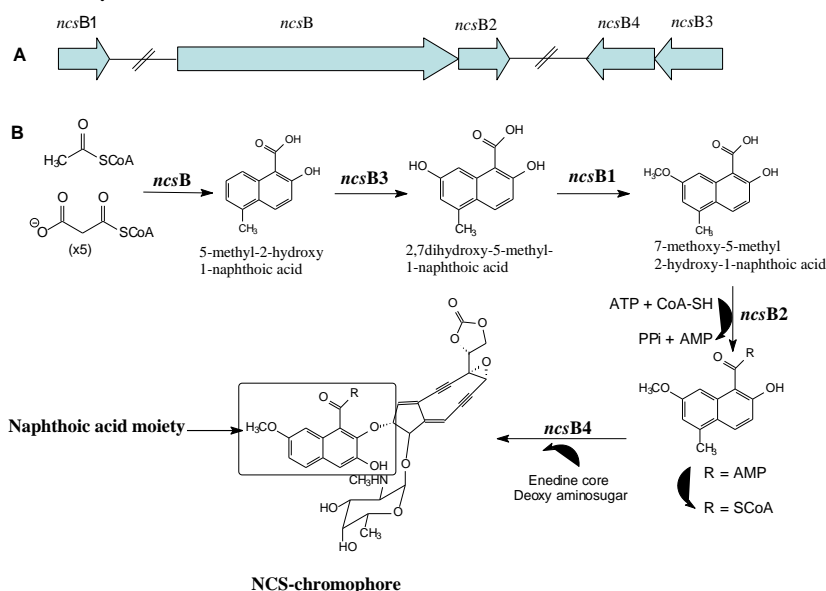


**Hình 1.3.** Cấu tạo của neocarzinostatin: (A) NCS-apoprotein; (B) NCS-chromophore

#### 1.2.1.1. NCS- chromophore

Phần có hoạt tính sinh học trong NCS là NCS-chromophore (**Hình 1.3B**) có cấu trúc hoá học rất dễ bị thay đổi nếu không có phần bảo vệ của NCS-apoprotein (**Hình 1.3A**). NCS-chromophore có khả năng ức chế sự tổng hợp DNA dẫn đến sự giáng hoá DNA trong tế bào.

NCS- chromophore đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính và độc tính tự nhiên của phức hợp. Công thức cấu tạo của NCS-chromophore có những liên kết kép nên có đặc tính không bền vững dưới tác động của nhiệt độ cao, tia cực tím và đặc biệt là pH cao. Nó có xu hướng nhận thêm hydro để tạo thành liên kết đơn.



**Hình 1.4.** (A) Các gen của chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 tham gia sinh tổng hợp gốc naphthoic acid; (B) Con đường sinh tổng hợp gốc naphthoic acid trong NCS (ncsB: naphthoic acid synthase; ncsB1: O-methyltransferase; ncsB2: CoA ligase; ncsB3: P-450 hydroxylase).

#### 1.2.1.2. NCS-apoprotein

NCS-apoprotein hay apoNCS (**Hình 1.3A**) là một protein có độ dài 11kDa gồm 113aa. Trong một nghiên cứu *in vitro* chứng minh rằng apoNCS có thể được thiết kế thành một phương tiện vận chuyển cho các loại thuốc mà không liên quan đến phần NCS-chromophore. NCS-apoprotein được nghiên cứu có tác dụng làm ổn định và vận chuyển hoạt tính sinh học của chromophore. Apoprotein đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính của thuốc bằng việc bảo vệ những chromophore không ổn định và giải phóng chromophore tới đích DNA.

#### 1.2.2. Các hướng nghiên cứu về sinh tổng hợp NCS

Bên cạnh tác dụng ưu việt của NCS đối với các tế bào ung thư nhưng do tác dụng phụ của nó nên xu hướng tạo ra các chất tương đồng với NCS nhưng làm giảm tổn thương của thuốc lên tế bào đích đã và đang được các nhà khoa học nghiên cứu áp dụng. Hoạt tính sinh học của NCS hay

các enediyne khác phụ thuộc rất nhiều vào phần chromophore. Sáng kiến tạo ra các sản phẩm được có cấu trúc tương tự như các enediyne tự nhiên bằng phương pháp thay đổi phần chromophore trong quá trình chuyển hóa được các nhà khoa học quan tâm rất nhiều và đã đạt được những thành công nhất định. Với việc chứng minh chức năng của gene *ncsB3* từ chủng *S. carzinostaticus* ATCC15944 là cơ hội để tạo ra các sản phẩm mới tương đồng với NCS mà sản phẩm này lại ít độc tính hơn, bền vững hơn.

### **1.3. Kỹ thuật sinh học phân tử áp dụng trong thiết kế vector chuyển gen**

#### **1.3.1. Kỹ thuật khuếch đại gen (PCR: Polymerase Chain Reaction)**

##### **1.3.1.1. Kỹ thuật PCR từ DNA khuôn mẫu**

Phương pháp PCR được Kary Mullis và cộng sự công bố tháng 10 năm 1985, tạo ra bước nhảy vọt của sinh học phân tử và kỹ thuật gen. Phương pháp này cho phép khuếch đại, tạo ra lượng lớn các bản sao của một đoạn DNA dưới tác dụng của enzym DNA polymerase..

Một phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ liên tục, sản phẩm được tạo ra ở chu kỳ trước lại làm khuôn cho chu kỳ tiếp theo nên số lượng bản sao tạo thành tăng theo cấp số nhân. Với N sợi khuôn ban đầu sau n chu kỳ sẽ có  $N \times 2^n$  sợi DNA được nhân lên. Một phản ứng PCR thường được thực hiện từ 20-40 chu kỳ.

##### **1.3.1.2. Kỹ thuật PCR trực tiếp từ khuẩn lạc**

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp để xác định tế bào vi khuẩn có mang gen mong muốn như phương pháp colony-PCR, cắt plasmid bằng các enzyme giới hạn hoặc PCR từ plasmid. Trong đó phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc cho phép phát hiện nhanh khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp mong muốn. Phương pháp này có ưu điểm là nhanh, ít tốn kém và đơn giản. Hiện nay, kỹ thuật này được ứng dụng rất rộng rãi trong nghiên cứu sinh học phân tử.

#### **1.3.2. Phương pháp giải trình tự gene**

Phương pháp giải trình tự gene đã đánh dấu bước ngoặt lớn trong lịch sử phát triển của bộ môn sinh học hiện đại.

##### **1.3.3. Kỹ thuật tách dòng (cloning)**

Kỹ thuật tách dòng là một công cụ hữu hiệu được sử dụng trong kỹ thuật di truyền và là bước khởi nguồn cho các kỹ thuật sau này. Mục đích của việc tách dòng là nhằm thu được một lượng lớn bản sao của trình tự gen quan tâm.

##### **1.3.4. Kỹ thuật biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn**

###### **1.3.4.1. Biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn E. coli bằng phương pháp sốc nhiệt (Phương pháp tạo tế bào khả biến)**

Vi khuẩn *E. coli* sau khi xử lý với  $\text{CaCl}_2$  sẽ làm cho màng tế bào trở nên khả nạp giúp cho DNA xâm nhập tế bào *E. coli* dễ dàng hơn.

Trong quá trình biến nạp chỉ có một phần nhỏ các plasmid được biến nạp, tuy nhiên đây vẫn là một kỹ thuật biến nạp quan trọng, nó có thể tạo ra tới  $10^9$  các tế bào biến nạp (tức thể biến nạp) khi đưa 1 microgam DNA vào thí nghiệm.

###### **1.3.4.2. Biến nạp plasmid vào tế bào A. tumefaciens bằng phương pháp xung điện**

Kỹ thuật biến nạp DNA plasmid vào *A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện là phương pháp biến nạp có hiệu quả cao đồng thời rút ngắn thời gian thí nghiệm. Tế bào được đặt trong một xung điện ngắn, xung điện này làm xuất hiện những lỗ tạm thời trên màng tế bào, khi đó những phân tử DNA có thể đi vào bên trong tế bào.

###### **1.3.4.3. Biến nạp plasmid vào xạ khuẩn *Streptomyces sp.* theo phương pháp tạo tế bào trần (protoplast)**

Protoplast (tế bào trần) là các tế bào trong đó có thành tế bào được loại bỏ và màng tế bào chất là lớp ngoài cùng nhất trong tế bào. Protoplast có thể thu được bằng enzyme lytic cụ thể để loại bỏ vách dung hợp. Phương pháp tạo tế bào trần ở xạ khuẩn *Streptomyces* lần đầu tiên được mô tả bởi Kieser và cộng sự.

## Chương 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

#### 2.1.1. *Chủng giống và môi trường nuôi cấy*

- Chủng xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944, vi khuẩn (*E. coli* XL1-Blue, *E. coli* ET12567, *Micrococcus luteus* ATCC9341) được cung cấp bởi Viện nghiên cứu khoa học sự sống (Trường Đại học Sun Moon, Hàn Quốc) và bảo quản tại Khoa Công nghệ sinh học - Viện Đại học Mở Hà Nội.

- Chủng xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944 là chủng hoang dại sản sinh ra kháng sinh neocarzinostatin (NCS) được nuôi cấy ở môi trường R2YE và môi trường N-Z amine.

- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E.coli* cũng như *Micrococcus luteus* là Luria - Bertani (LB).

#### 2.1.2. *Vector và các plasmid tái tổ hợp*

- Vector pGEM-T easy (Promega, USA) dùng trong chuyển sản phẩm PCR và giải trình tự đoạn DNA đã được tách dòng.

- pKC1139 là vector được dùng để chuyển gen gây đột biến.

- pIBR25 là vector được dùng để biểu lộ gen và chuyển gen vào xạ khuẩn.

- Plasmid chứa tổ hợp đột biến có tên gọi pKC-HP450 .

- Plasmid chứa *ncsB3* trong vector pIBR25 có tên gọi pIB3.

- Plasmid pFDNEO-S modified có chứa đoạn gen kháng neomycine (*neo<sup>r</sup>*), vector pKC1139 và pIBR25 được cung cấp bởi Viện nghiên cứu khoa học sự sống (Trường Đại học Sun Moon, Hàn Quốc).

#### 2.1.3. *Hóa chất*

Các hóa chất dùng để pha chế môi trường nuôi cấy vi khuẩn, tách chiết DNA hoặc dùng cho các kỹ thuật cơ bản trong nghiên cứu được đề cập trong phần Phụ lục.

#### 2.1.4. *Tách chiết DNA và giải trình tự gen*

- Phương pháp tách chiết DNA thực hiện theo qui trình chuẩn.

- Kiểm tra trình tự DNA của các gen được gửi đến công ty Genotech (Hàn Quốc).

### 2.2. Dụng cụ, thiết bị

Bình thủy tinh vô khuẩn 250ml dùng cho nuôi cấy xạ khuẩn, *E.coli*; buồng nuôi cấy vô trùng; nồi nuôi cấy lên men fermentor; máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC; máy phân tích khối phổ ESI/MS....

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu từ tháng 01/2013 đến tháng 12/2014 tại Khoa Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội kết hợp với Khoa khoa học sự sống, trường Đại học Sun Moon, Hàn Quốc.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. *Các bước chính trong nghiên cứu*

- Bước 1: Khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR và tách dòng

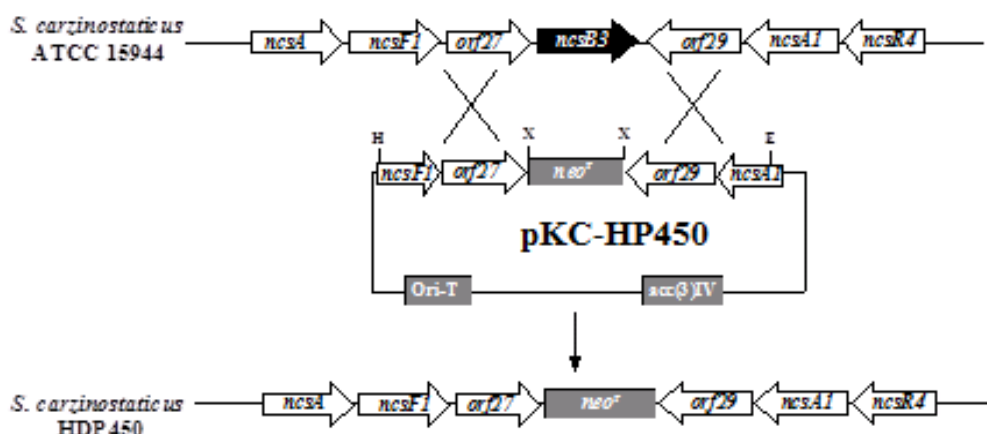
- Bước 2: Nối gen vào các vector pGEM-T Easy, pKC1139

- Bước 3: Chuyển gen (DNA plasmid của tổ hợp đột biến) vào tế bào trần của xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944.

- Bước 4: Sàng lọc khuẩn lạc đột biến kép.

- Bước 5: Chứng minh chủng đột biến và phân tích chất tách chiết từ chủng đột biến.

#### 2.4.2. Phương pháp gây đột biến mất gen *ncsB3* bằng trao đổi chéo.



Hình 2.5. Sơ đồ đột biến mất đoạn gen *ncsB3*

*ncsB3* là một trong các gen tham gia vào con đường sinh tổng hợp NCS với chức năng là P450-hydroxylase để chuyển 5-methyl-2-hydroxy-1-naphthoic acid thành 2,7-dihydroxy-5-methyl-1-naphthoic acid, đó là gốc naphthoic acid của NCS. Gây đột biến làm mất *ncsB3* khỏi bộ gen của chủng gốc *S.carzinostaticus* bằng phương pháp tạo trao đổi chéo đoạn DNA tương đồng (homologous recombinant).

Vector pKC1139 là vector dung để gây đột biến và đi kèm là gen kháng neomycin (*neo<sup>r</sup>*) có độ dài ~1kb để thay thế *ncsB3* tạo ra tái tổ hợp mới với tên gọi pKC-HP450 (Hình 2.5), tái tổ hợp này được trao đổi chéo đoạn tương đồng và loại bỏ gen *ncsB3* khỏi genome của chủng gốc *S.carzinostaticus*.

Tái tổ hợp pKC-PH450 được chuyển vào tế bào chủng gốc bằng phương pháp tế bào trần (protoplast) trong môi trường có chứa PGE để tạo tế bào tái tổ hợp. Sau đó các tế bào này được sàng lọc qua một số thể hệ để nuôi ở nhiệt độ 37°C, vì vector pKC1139 (có gen kháng apramycin) là vector bị tiêu hủy tại nhiệt độ 37°C. Như vậy rất nhanh chóng tạo quá trình chuyển gen kháng neomycin (*neo<sup>r</sup>*) vào hệ gen của chủng gốc.

### 2.5. Các kỹ thuật áp dụng thực hiện trong đề tài

#### 2.5.1. Kỹ thuật khuếch đại gen PCR (Polymerase chain reaction) và ghép nối vào vector

Phản ứng PCR, phản ứng ghép nối gen trong nghiên cứu được thực hiện theo quy trình và công thức được hướng dẫn trong tài liệu chuẩn [45]. Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng 2.1 (Phần gạch chân đậm là điểm cắt của enzyme giới hạn). Để đánh giá và kiểm tra sản phẩm PCR, DNA sau khi được tạo thành sau phản ứng PCR được chuyển vào vector pGEM-T easy (Promega, USA), đây là vector chuyên dùng để chuyển sản phẩm PCR và dùng giải trình tự. Trình tự PCR sau giải trình tự được so sánh với trình tự gen đã được đăng ký tại ngân hàng gen thế giới bằng sử dụng phần mềm BLAST để so sánh độ chính xác của sản phẩm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

**Bảng 2.1.** Thiết kế các cặp mồi cho phản ứng PCR trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Enzyme giới hạn
UHP450-FE	ATTGAATTC <del>CCCCGTACACGGGCGGCGG</del>	<i>EcoRI</i>
UHP450-RX	GGCCGGTCTAG <del>ACCACTCGACCATGCC</del>	<i>XbaI</i>
DHP450-FX	ATTTCTAG <del>ACTCGGTCATGGACACAACCTC</del>	<i>XbaI</i>
DHP450-RH	GGAAAGCTT <del>CGCCAACCGGACCAGGTC</del>	<i>HindIII</i>
P450-FX	ACATCTAG <del>AAGGAGGATGTGCCCTTAC</del>	<i>XbaI</i>
P450-RP	AGTCTGCAG <del>TCACCGGGCGAGAG</del>	<i>PstI</i>

### 2.5.2. Phản ứng cắt và ghép nối DNA bằng enzyme giới hạn

Enzyme giới hạn là những enzyme có khả năng nhận biết đoạn trình tự nucleotide đặc hiệu trên các phân tử DNA và cắt cả 2 sợi DNA bổ sung tại các vị trí đặc thù. Phản ứng ghép nối được thực hiện nhờ enzyme DNA ligase. DNA ligase là một enzyme xúc tác các phản ứng nối hai mảnh DNA bằng cách tạo cầu nối phosphodiester giữa đầu 5' (PO<sub>4</sub>) và đầu 3' (OH) của hai nucleotide đứng cạnh nhau. Thường dùng enzyme T4 DNA ligase

### 2.5.3. Phương pháp chuyển gen vào tế bào trần (protoplast) từ *S.carzinostaticus* ATCC15944

Dựa theo phương pháp của Kieser, tạo “tế bào trần” từ chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 đã được tiến hành. Chuyển plasmid DNA của pKC-HP450 chứa tổ hợp đột biến vào tế bào trần thực hiện trong môi trường có buffer đặc biệt chứa PEG (polyethylene glycin) được tiến hành theo phương pháp của Kieser.

### 2.5.4. Phương pháp sàng lọc khuẩn lạc chuyển gen

Việc tiến hành nuôi cấy những khuẩn lạc sau tiếp hợp trên các môi trường thích hợp một vài thế hệ sẽ tạo ra sự đa dạng di truyền thông qua quá trình trao đổi chéo, sự tái tổ hợp của các gen trong tế bào vi khuẩn, từ đó giúp chọn lọc được những dòng khuẩn lạc mang đặc điểm mong muốn. Sự dùng các kháng sinh nhạy cảm với các chủng vi khuẩn được sử dụng để sàng lọc trong nghiên cứu.

### 2.5.5. Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh

Mẫu thử được đặt lên lớp thạch đã cấy vi sinh vật kiểm định, kháng sinh từ mẫu thử khuếch tán vào môi trường thạch sẽ ức chế sự phát triển của vi sinh vật kiểm định tạo vòng kháng khuẩn. Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944 có khả năng ức chế sự phát triển của *M.luteus*.

### 2.5.6. Nuôi cấy xạ khuẩn và tách chiết kháng sinh neocarzinostatin

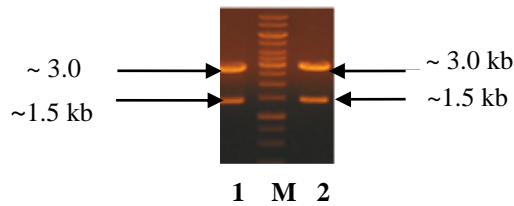
Nuôi cấy xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944 và chủng đột biến ở môi trường R2YE và N- Z amin ở nhiệt độ 28°C, có lắc 220 RPM/phút, trong vòng 5 ngày. Từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944, dùng amonium sulphate ở nồng độ bão hòa 40% để tách chiết NCS chomophore. Sản phẩm tách chiết được phân tích kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), phương pháp khối phổ (Mass spectrometry – ESI/MS), kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC- MS).

### Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Thiết kế tái tổ hợp mất gen *ncsB3* ở chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944

##### 3.1.1. Kết quả gắn *upstream* và *downstream* trong *pGEM - T easy*

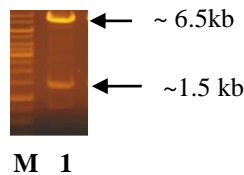
DNA tổng số được tách từ chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 sử dụng làm khuôn mẫu trong phản ứng PCR để nhân đoạn gen *upstream downstream* của *ncsB3* với cặp mồi UHP450-FE/UHP450-RX và DHP450-FX/DHP450-RH (Bảng 2.1). Sản phẩm của phản ứng PCR có kích thước khoảng gần 1.5kb (Hình 3.1 & Hình 3.2) phù hợp với chiều dài của đoạn gen quan tâm. Sản phẩm PCR được tinh sạch và gắn vào vector *pGEM-T Easy* thành công (Hình 3.3). Plasmid DNA được gửi đi kiểm tra xác định trình tự gen với tỷ lệ phù hợp cao (trên 95%).



**Hình 3.3.** Hình ảnh điện di DNA của *upstream* (1) và *downstream* (2) đã được chuyển vào *pGEM-T easy* khi phân cắt bằng *EcoRI/XbaI* (1); *XbaI/HindIII* (2); M là thang DNA chuẩn (10kb).

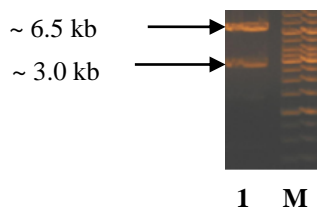
##### 3.1.2. Kết quả gắn *upstream*, *downstream* và gen *neor* vào vector *pKC1139*

###### 3.1.2.1. Kết quả gắn *upstream* và *downstream* vào vector *pKC1139*



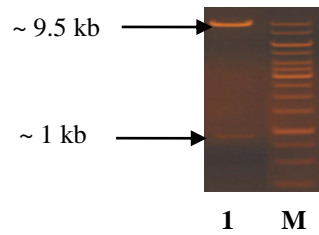
**Hình 3.6.** Hình ảnh điện di DNA của đoạn *upstream* (~1.5kb) được chuyển vào vector *pKC1139* (~6.5 kb) khi phân cắt bằng *EcoRI/XbaI* (1); M là thang DNA chuẩn (10kb).

Plasmid DNA được tinh sạch của đoạn *upstream* (~1.5kb) được gắn vào vector *pKC1139* (~6.5kb) tại vị trí *EcoRI/XbaI* và chuyển vào chủng *E.coli* XL1-Blue. Kết quả kiểm tra bằng cặp enzyme giới hạn *EcoRI/XbaI* cho thấy có 2 vạch điện di có kích thước 1.5kb và 6.5kb tương ứng với kích thước của đoạn *upstream* và *pKC1139* (Hình 3.6), tổ hợp này gọi tên *pKC-UP*. Sau đó gắn tiếp đoạn *downstream* vào tổ hợp *pKC-UP*, kết quả kiểm tra bằng cặp enzyme giới hạn *XbaI/HindIII* cho thấy có 2 vạch điện di có kích thước 3.0kb và 6.5kb tương ứng với kích thước của đoạn *upstream*, *downstream* và *pKC1139* (Hình 3.7), tổ hợp mang 2 gen này trong *pKC1139* được đặt tên *pKC-UD*.



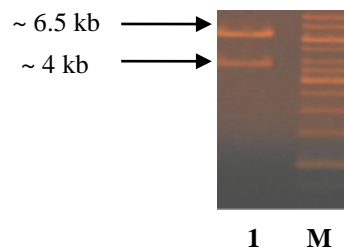
**Hình 3.7.** Hình ảnh điện di DNA của đoạn *upstream* và *downstream* (~3kb) đã được chuyển vào vector *pKC1139* (~6.5 kb) khi phân cắt bằng *XbaI/HindIII* (1); M là thang DNA chuẩn (10kb).

### 3.1.2.2. Kết quả gắn gen *neo<sup>r</sup>* vào pKC-UD



**Hình 3.8.** Hình ảnh điện di DNA của pKC-HP450 gồm đoạn upstream, downstream, pKC1139 (9.5 kb) và *neo<sup>r</sup>* (~1 kb) khi phân cắt bằng XbaI (1); M là thang DNA chuẩn (10kb).

Plasmid DNA của pKC-UD được tinh sạch và gắn thêm đoạn gen kháng neomycine (*neo<sup>r</sup>*) và gọi tên pKC-HP450 (*upstream*, *downstream*, *neo<sup>r</sup>* và pKC1139) với kích thước ước tính khoảng 10.5kb và được chuyển vào *E. coli* XL1-Blue. Kết quả kiểm tra bằng enzyme giới hạn XbaI cho thấy có 2 vạch điện di với kích thước 1.0kb và 9.5kb tương ứng với kích thước của đoạn *neo<sup>r</sup>* và pKC-UD (**Hình 3.8**), kết quả được khẳng định thêm khi dùng cặp enzyme giới hạn EcoRI/HindIII để kiểm tra. Kết quả hình ảnh điện di DNA cho thấy xuất hiện 2 vạch băng với kích thước 6.5kb và 4kb tương ứng với kích thước của pKC1139 và kích thước của tổ hợp 3 gen *upstream*, *downstream* và *neo<sup>r</sup>* (**Hình 3.9**).

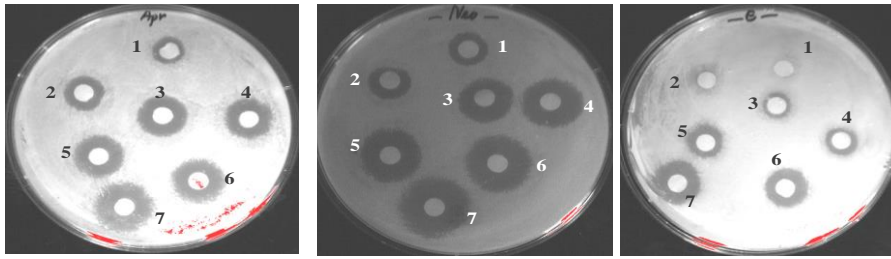


**Hình 3.9.** Hình ảnh điện di DNA chứng tỏ sự có mặt của đoạn upstream, downstream và *neo<sup>r</sup>* (~4 kb) và pKC1139 (~6.5 kb) khi phân cắt bằng EcoRI/HindIII; M là thang DNA chuẩn (10kb).

Như vậy, chúng tôi đã biến nạp thành công vector đột biến gen *ncsB3* (pKC-HP450) vào tế bào *E. coli* XL1 Blue sau đó tổ hợp plasmid này được chuyển vào chủng *E. coli* ET12567.

### 3.1.3. Kiểm tra độ nhạy với kháng sinh của *S. carzinostaticus* ATCC15944

Sử dụng 3 loại kháng sinh (neomycin, apramycin và erythromycin) để kiểm tra độ nhạy của chủng xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944 cho thấy chủng xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944 rất nhạy cảm với 3 loại kháng sinh đã được chọn mặc dù ở nồng độ kháng sinh ở mức rất thấp 1µg/ml (**Hình 3.10**). Do vậy chúng tôi đã sử dụng neomycin làm kháng sinh kiểm định và lựa chọn đột biến. Nếu tế bào đã bị gây đột biến mất gen *ncsB3* và được thay thế bằng *neo<sup>r</sup>* thì chủng đột biến này sẽ tồn tại trong môi trường có kháng sinh neomycin; kháng sinh apramycin được chọn làm kháng sinh để sàng lọc đột biến kép.



- |                  |                    |                   |
|------------------|--------------------|-------------------|
| <b>1: 1µg/ml</b> | <b>4: 7.5µg/ml</b> | <b>7: 15µg/ml</b> |
| <b>2: 3µg/ml</b> | <b>5: 10µg/ml</b>  |                   |
| <b>3: 5µg/ml</b> | <b>6: 12µg/ml</b>  |                   |

**Hình 3.10.** Kiểm tra độ nhạy của chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 với các nồng độ kháng sinh khác nhau của 3 loại: apramycin, neomycin và erythromycin.

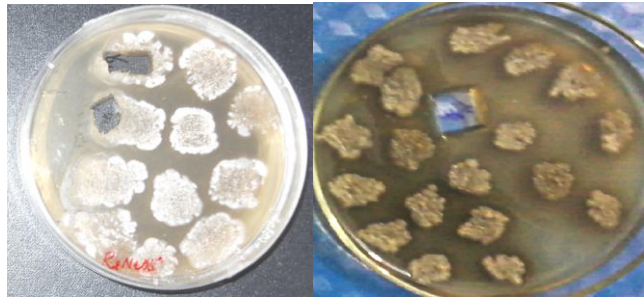
**3.1.4. Chuyển tổ hợp gen vào *S.carzinostaticus* ATCC15944**

**3.1.4.1. Tạo tế bào trần và chuyển tổ hợp đột biến gen vào chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944**

Tế bào trần được tạo ra từ chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944 theo phương pháp của Kieser. Sau đó plasmid DNA của pKC-HP450 được tách từ chủng *E. coli* ET12567 được chuyển vào tế bào trần theo phương pháp chuyển gen. Với nồng độ kháng sinh neomycin được xác định là 50µg/ml với các mẫu chuyển gen để lựa chọn các khuẩn lạc (chủng tự nhiên *S.carzinostaticus* ATCC15944 bị ức chế không phát triển được), các khuẩn lạc đã mọc tốt sau chuyển gen 36 giờ.

**3.1.4.2. Sàng lọc đột biến kép mất gen *ncsB3***

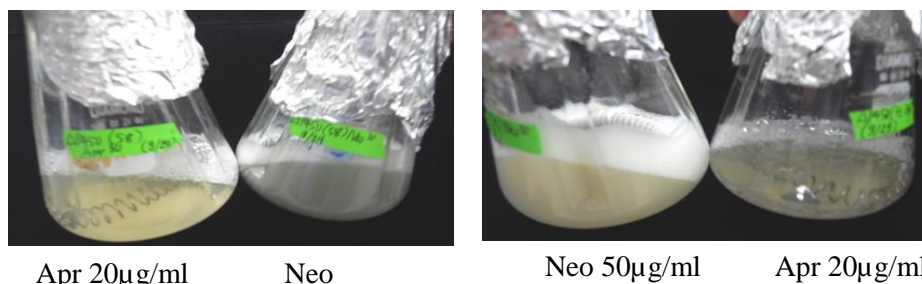
Để lựa chọn ra được khuẩn lạc có đột biến kép mất hoàn toàn *ncsB3*, các khuẩn lạc được lựa chọn sẽ được nuôi cấy trong môi trường dịch R2YE bổ sung 50µg/ml neomycin và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C. Các sợi xạ khuẩn được pha loãng sau đó dàn đều trên đĩa thạch R2YE không có kháng sinh và ủ ở tủ ẩm vô khuẩn 28°C. Sau khoảng 60-72 giờ xuất hiện các khuẩn lạc tiến hành lấy ngẫu nhiên khoảng 500 khuẩn lạc cấy đồng thời trên 2 môi trường khác nhau là đĩa thạch R2YE bổ sung 50µg/ml neomycin và đĩa thạch R2YE bổ sung 20 µg/ml apramycin (R2YE/Neo<sup>50</sup>, R2YE/Apr<sup>20</sup>) (**Hình 3.12**). Khuẩn lạc nào có cả gen kháng neomycin và gen nhạy cảm với apramycin (*neo<sup>r</sup>.apr<sup>s</sup>*) sẽ là các khuẩn lạc tiềm năng cho việc lựa chọn chủng đột biến kép mất gen *ncsB3* hoàn toàn trong genome.



**Hình 3.12.** Các khuẩn lạc được cấy riêng rẽ trên đĩa R2YE/Neo<sup>50</sup> và R2YE/Apr<sup>20</sup>

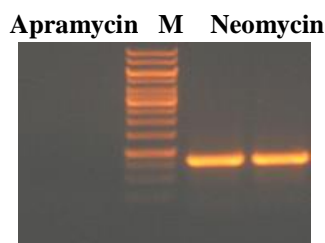
Ở thế hệ thứ 5, trong số khoảng hơn 500 khuẩn lạc được lựa chọn, chúng tôi đã phát hiện ra 2 khuẩn lạc phát triển rất tốt ở môi trường R2YE/Neo<sup>50</sup> nhưng không mọc trong môi trường R2YE/Apr<sup>20</sup>. Khi nuôi cấy 2 khuẩn lạc này ở trong môi trường lỏng R2YE có kháng sinh với nồng độ tương ứng cũng thu được kết quả tương tự (**Hình 3.13**).





**Hình 3.13.** Hai khuẩn lạc được nuôi cấy trong môi trường lỏng R2YE/Neo50, R2YE/Apr20

Điều đó chứng tỏ rằng trong genome của chủng đột biến đã chứa gen kháng kháng sinh neomycine (*neo<sup>r</sup>*) và không còn vector pKC1139 nữa. Để khẳng định 2 khuẩn lạc này đã mất hoàn toàn *ncsB3* trong genome và thay thế bởi gen kháng neomycin, DNA tổng số được tách từ hai khuẩn lạc và được làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR. Khi sử dụng cặp mồi của gen kháng neomycin (*neo<sup>r</sup>*) và cặp mồi của gen kháng apramycin (*apr<sup>r</sup>*) cho thấy sản phẩm PCR chỉ xuất hiện ở cặp mồi của gen kháng neomycin (~1kb) tuy nhiên không thấy sản phẩm PCR đối với cặp mồi thiết kế cho gen kháng apramycin (**Hình 3.14**)

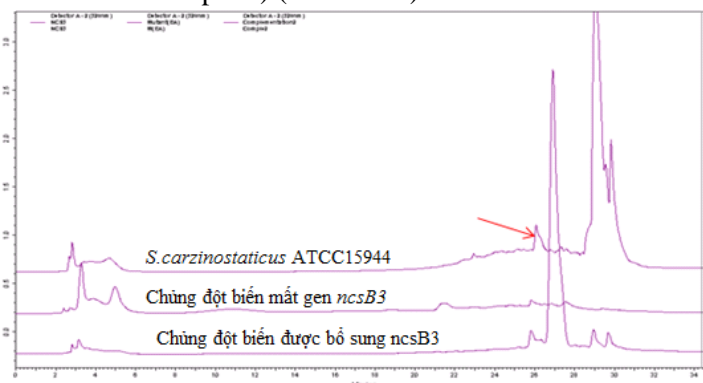


**Hình 3.14.** Hình ảnh sản phẩm PCR với sự có mặt của gen kháng neomycin (*neo<sup>r</sup>*) thay thế cho *ncsB3* và không còn gen kháng apramycin (*apr<sup>r</sup>*)

### 3.2. Kiểm tra hoạt tính sinh học chủng đột biến

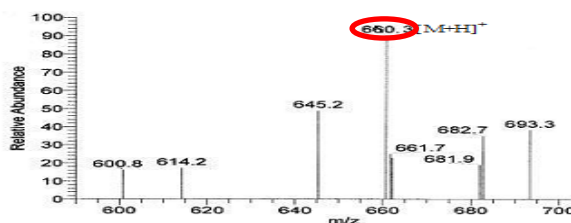
#### 3.2.1. Phân tích sản phẩm tách chiết

Sản phẩm tách chiết từ chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 cũng như chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944 và chủng *S.carzinostaticus* HP450/pIB3 (chủng đột biến được bổ sung lại *ncsB3*) được phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC cho thấy NCS-chromophore đã mất hoàn toàn ở chủng đột biến trong khi đó NCS-chromophore quan sát rất rõ ở chủng gốc *S.carzinostaticus* ATCC15944 và chủng xạ khuẩn bổ sung lại *ncsB3* (*S.carzinostaticus* HP450/pIB3) (**Hình 3.15**).



**Hình 3.15.** Sắc ký đồ HPLC phân tích sản phẩm tách chiết từ các chủng *S.carzinostaticus* ATCC15944, *S.carzinostaticus* HP450 (chủng đột biến mất gen *ncsB3*) và *S.carzinostaticus* HP450/pIB3 (chủng đột biến được bổ sung lại *ncsB3*)

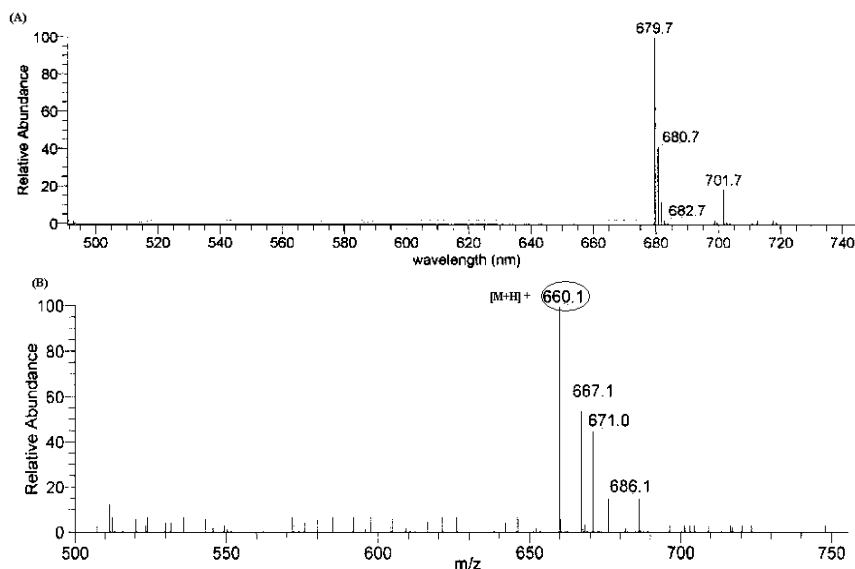
Điều đó cho thấy khả năng khi gây đột biến mất gen *ncsB3* đã không tạo ra được NCS-chromophore, *ncsB3* là gen đóng vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp naphthoic acid cũng như NCS-chromophore; hoặc chủng xạ khuẩn gây đột biến mất gen *ncsB3* đã tạo ra sản phẩm khác do vậy không còn đặc hiệu để apo-NCS bám vào. NCS-chromophore được tách chiết từ chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 có khối lượng  $m/z$   $[M+H]^+ = 660$  (Hình 3.16).



**Hình 3.16.** Phân tích sản phẩm tách chiết thu được từ *S.carzinostaticus* ATCC15944 bằng phương pháp khối phổ ESI/MS

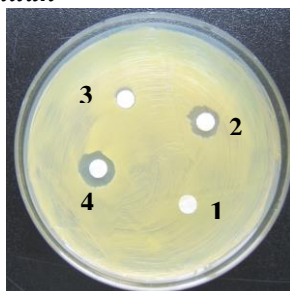
Tiếp tục phân tích các chất tách chiết từ chủng đột biến cho thấy không có khối lượng tương ứng với khối lượng của NCS-chromophore  $m/z$   $[M+H]^+ = 660$  (Hình 3.17A). Tuy nhiên ở chủng xạ khuẩn khi bổ sung *ncsB3* vào chủng đột biến *S.carzinostaticus* HP450 thì sản phẩm NCS-chromophore lại được tạo ra với khối lượng của NCS-chromophore  $m/z$   $[M+H]^+ = 660$  (Hình 3.17B).

Với kết quả phân tích chất bằng kỹ thuật sắc ký lỏng trên cao HPLC và kỹ thuật khối phổ ESI/MS cho thấy chủng xạ khuẩn gây đột biến mất gen *ncsB3* đã không tạo ra NCS-chromophore trong khi chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 cũng như chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* HP450/pIB3 đều thu được chất này.



**Hình 3.17.** Phân tích chất tách chiết được từ các chủng (A) *S.carzinostaticus* HDP450; (B) *S.carzinostaticus* HDP450/pIB3 bằng kỹ thuật ESI/MS.

### 3.2.2. So sánh hoạt tính kháng khuẩn



**Hình 3.18.** Kiểm tra hoạt tính sinh học của các chất với chủng *M. luteus*: Methanol (1); NCS tách từ chủng gốc *S. carzinostaticus* ATCC15944 (2); chủng đột biến *S. carzinostaticus* HP450 (3); và chủng đột biến bổ sung *ncsB3* *S. carzinostaticus* HP450/pIB3 (4).

Chất chiết tách từ 3 chủng xạ khuẩn được kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn với chủng *Micrococcus luteus*. Kết quả cho thấy trong khi chủng xạ khuẩn *S. carzinostaticus* ATCC15944 có hoạt tính kháng khuẩn với *Micrococcus luteus* nhưng chủng xạ khuẩn đột biến *S. carzinostaticus* HP450 không có hoạt tính kháng khuẩn với chủng vi khuẩn này. Hoạt tính kháng khuẩn sẽ xuất hiện trở lại ở chủng xạ khuẩn khi bổ sung trở lại *ncsB3* vào chủng đột biến *S. carzinostaticus* HP450 (**Hình 3.18**).

Qua kết quả kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của chủng đột biến càng có thêm bằng chứng cho thấy khi gây đột biến mất gen *ncsB3* sẽ không tạo ra NCS-chromophore do vậy hoạt tính sinh học kháng khuẩn đối với chủng vi khuẩn *Micrococcus luteus* cũng không còn nữa. Vậy các chất tạo ra ở chủng xạ khuẩn đột biến còn có tác dụng với các tế bào ung thư như chủng gốc hay không? Điều này còn phải được tiếp tục nghiên cứu trong thời gian tới đây.

#### **Chương 4: KẾT LUẬN**

Qua kết quả nghiên cứu “Thiết kế tái tổ hợp bằng phương pháp gây đột biến mất gene *ncsB3* từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944 và kiểm tra hoạt tính sinh học của chủng đột biến” chúng tôi đã rút ra được kết luận sau:

##### **1. Thiết kế thành công tái tổ hợp đột biến gen *ncsB3* từ chủng *Streptomyces carzinostaticus* ATCC15944.**

- Genome của chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 đã được gây mất gen *ncsB3* và thay thế bởi gen kháng neomycine (*neo<sup>r</sup>*) với độ dài gần 1kb. Sau đó sử dụng vector pKC1139 là vector rất nhạy cảm với nhiệt độ trên 40°C và có gen kháng apramycin (*apr<sup>r</sup>*) để mang tổ hợp gen đột biến.
- Tổ hợp đột biến có tên gọi pKC-HP450 được chuyển vào chủng vi khuẩn *E.coli* XL1 Blue và *E. coli* ET12567.
- Tổ hợp mang gen đột biến được chuyển vào chủng xạ khuẩn *S.carzinostaticus* ATCC15944 bằng phương pháp chuyển dạng nguyên hình thông qua tế bào trần.
- Các khuẩn lạc được sàng lọc để chọn lọc được chủng đột biến kép mất gen *ncsB3* hoàn toàn trong genome của *S.carzinostaticus* ATCC15944.
- Khả năng định tính chính xác của chủng đột biến thu được qua quá trình sàng lọc.

##### **2. Bước đầu qua kiểm tra hoạt tính sinh học của chủng xạ khuẩn đột biến cho thấy:**

- NCS-chromophore không quan sát thấy ở chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 qua phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng trên cao HPLC và kỹ thuật khối phổ ESI/MS.
- Chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 không có tính kháng khuẩn đối với chủng vi khuẩn *Micrococcus luteus*.

#### **Chương 5: KHUYẾN NGHỊ**

Qua kết quả nghiên cứu chúng tôi đưa ra một số khuyến nghị sau:

1. Thử nghiệm các phương pháp khác để tách chiết và phân tích chất thu được từ chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450.
2. Kiểm tra hoạt tính của chất tách chiết từ chủng xạ khuẩn đột biến *S.carzinostaticus* HP450 đối với tế bào ung thư.